

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-345725

(43)Date of publication of application : 27.12.1993

(51)Int.Cl.

A61K 35/84
A61K 31/715
A61K 37/02

(21)Application number : 03-162220

(71)Applicant : MIZUNO TAKU
ITO HITOSHI
FUJI SEITO KK
SUZUKI CHIHARU

(22)Date of filing : 05.06.1991

(72)Inventor : MIZUNO TAKU
UMA IWAO
ITO HITOSHI
SUZUKI CHIHARU**(54) WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDE ORIGINATED FROM MUSHROOM, ITS PRODUCTION AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE POLYSACCHARIDE AS MAIN INGREDIENT**

(57)Abstract:

PURPOSE: To efficiently produce a water-soluble polysaccharide useful as an antitumor agent from *Hohenbuelia serotina* which is a mushroom belonging to the genus *Panellus*.

CONSTITUTION: *Hohenbuelia serotina* or its dried product is extracted with an organic solvent, and the extraction residue is preferably extracted with heated aqueous solvent to obtain (A) a mannogalactoglucan conjugated protein containing 9.5-10.5% of a protein and 76-84% of a saccharide [saccharide composition is G1:G2:M=100:86-96:52-58 (G1 = glucose; G2 = galactose; M= mannose)] or 10.3-11.3% of a protein and 84-93% of a saccharide (saccharide composition is G1:G2:M=100:28-32:27-31), (B) a mannoglucogalactan conjugated protein containing 5.1-5.7% of a protein and 57-63% of a saccharide (saccharide composition is G1:G2:M=100:130-144:85-95), or (C) a fucomannoglucogalactan conjugated protein containing 3.7-4.1% of a protein and 70-77% of a saccharide (saccharide composition is G1:G2:M:fucose = 100:138-152:84-92:25-29) which is useful as the antitumor agent.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

JP-A-5-345725

published on December 27, 1993

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-345725

(43)公開日 平成5年(1993)12月27日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/84		A 7167-4C		
31/715		8314-4C		
37/02	ADU	8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数12(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平3-162220

(22)出願日 平成3年(1991)6月5日

(71)出願人 000193542

水野 卓

静岡県藤枝市青南町5-5-9

(71)出願人 000118095

伊藤 均

三重県津市城山2丁目3-10

(71)出願人 591024270

フジ製糖株式会社

静岡県清水市清開1丁目4番10号

(71)出願人 591144497

鈴木 千春

静岡県静岡市大谷3800-211

(74)代理人 弁理士 小林 雅人 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キノコに由来する水溶性多糖類、その製造方法及び該水溶性多糖類を主剤とする抗腫瘍剤

(57)【要約】

【目的】 中国の吉林省等の東北地方に自生する食用キノコの一つであり、古くから関節炎等に効く民間薬として伝承され、酒に浸漬して飲用されていたワサビタケ科のキノコである黄▲磨▼(*Hohenbuehelia serotina*)の薬効成分を化学的に解析し、その有効な用途を発見する。又、本発明の他の目的は、黄▲磨▼の薬効成分を効率良く得ることのできる方法を提供することにある。

【構成】 本発明の水溶性多糖体は、黄▲磨▼の有機溶媒不溶画分から、水系溶媒にて抽出されるマンノガラクトグルカン蛋白複合体、マンノグルコガラクトタン蛋白複合体あるいはフコマンノグルコガラクトタン蛋白複合体であることを特徴とするものであり、又、本発明の水溶性多糖体の製造方法は、黄▲磨▼あるいはその乾燥物を有機溶媒により抽出し、その抽出残渣を更に水系溶媒で抽出することを特徴とするものであり、更に、本発明の抗腫瘍剤は、上記本発明の水溶性多糖体を主剤とすることを特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 黄▲磨▼の有機溶媒不溶画分から、水系溶媒にて抽出されるマンノガラクトグルカン蛋白複合体であることを特徴とする水溶性多糖類。

【請求項2】 蛋白質9.5～10.5%と、糖76～84%（但し、糖組成は、グルコース：ガラクトース：マンノース＝100：86～96：52～58である）とを含む請求項1に記載の水溶性多糖類。

【請求項3】 蛋白質10.3～11.3%と、糖84～93%（但し、糖組成は、グルコース：ガラクトース：マンノース＝100：28～32：27～31である）とを含む請求項1に記載の水溶性多糖類。

【請求項4】 黄▲磨▼の有機溶媒不溶画分から、水系溶媒にて抽出されるマンノグルコガラクタン蛋白複合体であることを特徴とする水溶性多糖類。

【請求項5】 蛋白質5.1～5.7%と、糖57～63%（但し、糖組成は、グルコース：ガラクトース：マンノース＝100：130～144：85～95である）とを含む請求項4に記載の水溶性多糖類。

【請求項6】 黄▲磨▼の有機溶媒不溶画分から、水系溶媒にて抽出されるフコマンノグルコガラクタン蛋白複合体であることを特徴とする水溶性多糖類。

【請求項7】 蛋白質3.7～4.1%と、糖70～77%（但し、糖組成は、グルコース：ガラクトース：マンノース：フコース＝100：138～152：84～92：25～29である）とを含む請求項6に記載の水溶性多糖類。

【請求項8】 黄▲磨▼あるいはその乾燥物を有機溶媒により抽出し、その抽出残渣を更に水系溶媒で抽出することを特徴とする水溶性多糖類の製造方法。

【請求項9】 水系溶媒を加熱して抽出する請求項8に記載の水溶性多糖類の製造方法。

【請求項10】 黄▲磨▼あるいはその乾燥物を有機溶媒により抽出し、その抽出残渣を更に水系溶媒で抽出した後、アルコール沈殿法、イオン交換クロマト法あるいはアフィニティクロマト法等により、含有組成分量の異なる水溶性多糖類を得ることを特徴とする水溶性多糖類の製造方法。

【請求項11】 請求項1乃至7に記載された水溶性多糖類を主剤とすることを特徴とする抗腫瘍剤。

【請求項12】 請求項8乃至10に記載された製造方法により得られる水溶性多糖類を主剤とすることを特徴とする抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ワサビタケ科のキノコである黄▲磨▼(*Hohenbuehelia serotina*)に由来する水溶性多糖類、その製造方法及びその水溶性多糖類を主剤とする抗腫瘍剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする問題点】 黄▲磨▼は、中国の吉林省等の東北地方に自生する食用キノコ（但し、栽培はされていない）の一つであり、古くから関節炎等に効く民間薬として伝承され、酒に浸漬して飲用されていた。

【0003】 しかしながら、現在に至るまで、その薬効成分の化学的解析はなされておらず、不明のままであった。

【0004】 本発明は、上述した従来技術を背景としてなされたもので、その目的は、黄▲磨▼の薬効成分を化学的に解析し、その有効な用途を発見することにある。

【0005】 又、本発明の他の目的は、黄▲磨▼の薬効成分を効率良く得ることのできる方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 即ち、本発明の水溶性多糖類は、黄▲磨▼の有機溶媒不溶画分から、水系溶媒にて抽出されるマンノガラクトグルカン蛋白複合体、マンノグルコガラクタン蛋白複合体あるいはフコマンノグルコガラクタン蛋白複合体であることを特徴とするものであり、又、本発明の水溶性多糖類の製造方法は、黄▲磨▼あるいはその乾燥物を有機溶媒により抽出し、その抽出残渣を更に水系溶媒で抽出することを特徴とするものであり、更に、本発明の抗腫瘍剤は、上記水溶性多糖類を主剤とすることを特徴とするものである。

【0007】 尚、水系溶媒は、好ましくは加熱して使用するものであり、又、有機溶媒の抽出残渣を水系溶媒で抽出した後、アルコール沈殿法、イオン交換クロマト法あるいはアフィニティクロマト法等により、含有組成分量の異なる水溶性多糖類を得ることもできる。

【0008】 即ち、本発明の発明者らは、中国の山野に自生する前記黄▲磨▼あるいはその乾燥物に含まれる成分につき研究を続けた結果、新規な水溶性多糖類を見だし、これを、サルコーマ180固型癌を移植したJCR/S1c系マウスに投与したところ、顕著な抗腫瘍活性を示すことを知得し、更に研究を重ねた結果、上記抗腫瘍活性を示す成分がキシロース、マンノース、ガラクトース等を随伴する β -(1→6)； β -(1→3)-D-グルカン蛋白複合体であることを見だし、本発明の完成に至ったものである。

【0009】 以下に本発明を詳細に説明する。

【0010】 まず、本発明製造方法について説明すれば、最初に黄▲磨▼の子実体あるいはその乾燥物に有機溶媒を加え、常温で適宜時間放置して抽出する。尚、本発明でいう「黄▲磨▼の子実体あるいはその乾燥物」という語には、それらのみならず、黄▲磨▼を人工培養（菌床栽培あるいは液体培養）したときに得られる菌糸体あるいはその培地での生産物をも含まれるものである。

【0011】 上記有機溶媒としては、エチルエーテル、

ヘキサン、エチルアルコール、メチルアルコール、アセトン等を例示することができ、これらのうちエチルアルコール、メチルアルコール、アセトン等については約10～20%に含水しているものを使用し得る。これら有機溶媒の使用量は、例えば約10～100倍量であり、約80℃以下の温度で抽出を行なうことが好ましい。

【0012】次いで、上記有機溶媒可溶成分を濾過して低分子成分を除去し、その残渣をそのまま、あるいは必要に応じ適宜に乾燥し、当該抽出残渣を熱水で適宜時間煮沸して抽出する。この場合、熱水は、例えば約10～100倍量使用するが、必ずしも熱水である必要はなく、含水率約80%以上であれば、例えばエタノール、メタノールあるいはアセトン等を使用することができ

る。【0013】上記抽出液を冷却した後、その上澄液を分離し、必要に応じ当該分離上澄液をある程度濃縮してから、これに濃縮液の例えば約5倍量の高純度溶媒液を加えて沈殿物を得、上澄液とを分離して沈殿物のみを取り出し、当該沈殿物を洗滌し、乾燥して粉末を得るのである。

【0014】上記高純度溶媒としては、例えばエタノール、メタノールあるいはアセトン等を挙げることができ、好ましくはその純度は約99%以上である。

【0015】このようにして得られた粉末が、本発明の水溶性多糖類であり、次のような理化学的性質を有する。

(イ)色：凍結乾燥して得られる本発明水溶性多糖類の粉末は白色ないし灰白色を呈する。

*

多糖体	収率% (対乾燥子実体)	糖 (%)	糖組成 (GLCによる) グルコースガラクトースマンノースフコース	蛋白質%	比旋光度
(1)	4.0	79.8	100: 91: 55: ±	10.0	+42.8°
(2)	1.0	59.8	100: 137: 90: ±	5.4	+70.7°
(3)	0.1	73.3	100: 145: 88: 27	3.9	+72.9°
(4)	0.2	88.3	100: 30: 29: ±	10.8	+14.0°

【0018】又、上記表1に示した本発明多糖類は以下のようなスペクトルデータを有する。

(ア)赤外線吸収スペクトル(KBr法)：上記本発明多糖類(1)乃至(4)の赤外線スペクトルは図1に示すとおりで、いずれも890cm⁻¹近辺にβ-グルコシド結合を示す吸収が認められ、β-D-グルカンであることがわかる。

(イ)核磁気共鳴スペクトル：多糖類(2)及び(4)の10～20mgを0.3MNaOD・D₂Oに溶解して、JEOLE製GSX-400スペクトルメーターによって測定した結果は図2、3(¹H-NMRスペクトル分析)、及び図4、(¹³C-NMRスペクトル分析)に示す通りである。これらの分析の結果、本発明多糖類はガラクトース、マンノース、フコース等を随伴するβ-(1→6)：β-(1→3)-D-グルカン蛋白複合体であることが確認される。

* (ロ)溶解性：水、DMSO(ジメチルスルホキシド)、稀アルコールに可溶であり、アセトン、メタノール、エタノール、エチルエーテル等の有機溶媒には不溶である。

(ハ)呈色反応：フェノール硫酸およびアンスロン硫酸反応による糖の反応は陽性を示し、Lowry法による蛋白質(牛血清アルブミン換算)を3.9～10.8%を含有する蛋白多糖類である。

(ニ)糖含量：フェノール硫酸法による糖含量(グルコース換算)は59.8%～88.3%である。

(ホ)糖組成：N・硫酸で3～5時間100℃で加水分解するとき、生成する構成糖をアルジトールアセテートに誘導してからガスクロマトグラフ法で検索・定量すると、グルコース(100)に対してガラクトース(91～145)、マンノース(29～88)、フコース(痕跡～27)からなり、この他にキシロース、アラビノース、リボースの痕跡が検出される。

(ヘ)平均分子量：トヨパールHW-65Fカラムを用いるゲル濾過法(標準デキストラをマーカーとする)によって2～3万であることがわかる。

【0016】更に、上記多糖類を、イオン交換クロマト法、ゲル濾過法、アフィニティクロマト法等による精製手段に付せば、含有組成分量の異なる本発明の本発明多糖類に分別することができる。

【0017】上記分別操作により、例えば、以下の表1に示すような本発明多糖類を得ることができる。

【表1】

(ハ)比旋光度[α]_D²⁰：+14.0°～+72.9°(c=0.5、10%NaOH)であり、β-結合性のD-グルカンであることを示している。

【0019】一方、本発明の抗腫瘍剤は、上記説明した本発明の多糖類を主剤とし、錠剤、散剤あるいはカプセル剤等の経口投与剤、又は、注射剤等の非経口剤に製剤されたものである。本発明の抗腫瘍剤における多糖類の含有量は、当該多糖類の有効使用量が、経口投与(p.o.)で10～1000mg/Kg、非経口投与(腹腔内投与,i.p.)で1～10mg/Kg(いずれもマウスを使用した実験による数値)であるので、これらの値を考慮して決定すればよい。

【0020】

【実施例】次に本発明を実施例により更に詳細に説明する。

50 【0021】黄▲磨▼乾燥子実体の粉末3000gに、

抽出溶媒として85%濃度のエタノール10リットルを加え、室温で時々攪拌しつつ1日放置して溶媒抽出を行う。次にエタノール可溶画分を吸引濾過して低分子成分を除去した後、残渣を70℃以下で通風しながら乾燥する。

【0022】この乾燥したエタノール抽出残渣500gを、100℃の熱水3リットルで3時間攪拌しつつ煮沸し、熱水時抽出を行う。熱水抽出液を冷却し、遠心分離によってその上澄液に5倍量の99%濃度のエタノールを加え、多糖類を沈殿させ、遠心分離によって得た沈殿を流水中で透析後、凍結乾燥して多糖類(1)を粉末として得る。収量は20gであった。

【0023】次いで、この多糖類(1)の粉末15gをイオン交換クロマト法、即ちDEAEセルロース(C1⁻)カラム(3×70cm)を用いて水によって溶出し、非吸着画分である多糖類(2)と吸着画分とに大別する。

【0024】尚、上記非吸着画分である多糖類(2) 2.4gをトヨパールHW-65Fカラム(3.5×35cm)を用いるゲル濾過法(0.2M食塩溶液で溶出)によって多糖類(2)-a、-b、-cおよび不溶部として多糖類(2)-inに分割したが、抗腫瘍活性は多糖類(2)より増大しなかった。

【0025】一方、DEAEセルロース(C1-)カラムに吸着された吸着画分は、0→2M食塩溶液による濃度勾配溶出によって、イオン強度の弱い順番に多糖類(3)(162mg)、多糖類(4)(577mg)、多糖類(A)(660mg)および多糖類(B)(490mg)が得られた。これらのうち、多糖類(3)と多糖類(4)に高い抗腫瘍活性が見られた。上記分別操作を、以下に示す。

【化 1】

黄▲磨▼粉末

85%エタノール処理（室温24時間）

残渣

熱水抽出

抽出液

エタノール沈殿処理（5倍量）

沈殿（選析、凍結乾燥）{多糖類（1）}

DEAE-セルロースC1⁻) カラム処理

非吸着部（多糖類（2））

吸着部

濃度勾配溶出
(0→2M食塩溶液)

多糖類 (3)

多糖類 (4)

【0026】薬理作用

腹腔内投与法によるサルコーマ180固形ガンに対する効果

JCR/S16マウス腹腔内で継代されているサルコーマ180腹水ガンを腋窩部皮下に移植し、移植24時間後より、本発明の多糖を10mg/kgマウス体重含む本発明抗腫瘍剤を腹腔内に投与した。投与回数は1日1回10日間とし、移植3週間後に腫瘍の直径を測定し、それを対照群と比較して腫瘍抑制率を算出した。また、6週間後には腫瘍完全消失割合と生存割合を調べた。その結果を以下の表2に示す。

【表2】

試験群	平均腫瘍体積 (cm^3)	腫瘍抑制率 (%)	生存率 (%)	腫瘍完全 消失率	死亡率 (61日目)
対照群 (精製水のみ投与)	46.2±24.0	0	100	0/10	10/10
多糖体(1)	14.2±17.2	69.3	173.6	2/7	1/7
多糖体(2)	14.3±19.6	69.1	166.6	3/7	2/7
多糖体(3)	15.3±17.3	76.6	157.8	1/7	4/7
多糖体(4)	10.8±20.2	76.6	157.8	3/7	2/7

【0027】上記表2に示すように、本発明の抗腫瘍剤は、良好な腫瘍抑制率、生存率、腫瘍完全消失率を示し、死亡率（61日目）も低く、良好な効果を発揮するものである。

【0028】急性毒性

JCR/S1c系の雄性マウス(5週)の腹腔内又は経口投与による急性毒性試験(1週間観察)において、本発明の多糖類は1000mg/kgで死亡率は0/6であり、飼料摂取量、体重増加量、尿検査、血液検査結果および相対的臓器重量比等、対照群との間に統計学的有

意差は認められなかった。

【図面の簡単な説明】

【図１】図１は本発明多糖類（１）～（４）の赤外線スペクトルである。

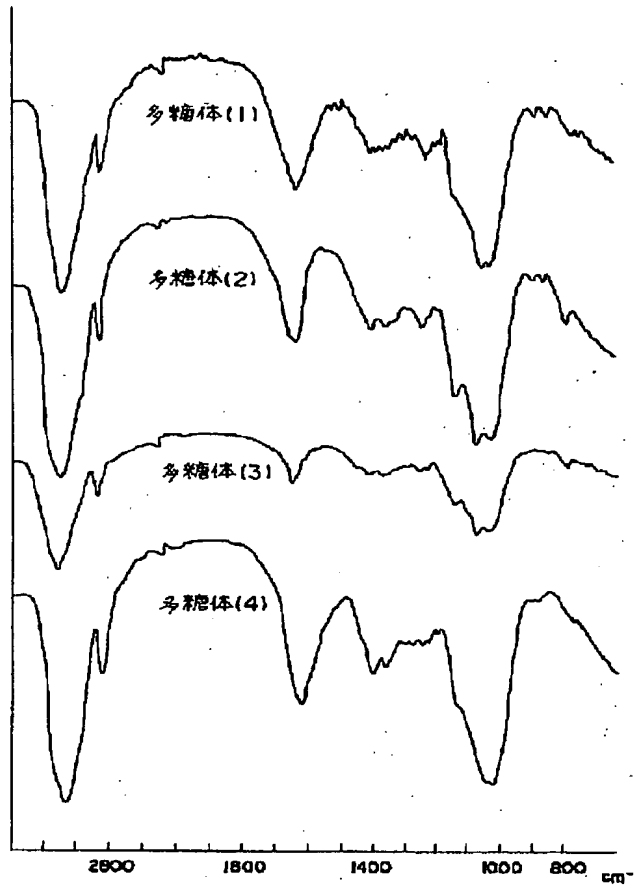
【図2】図2は本発明多糖類(2)の¹H-NMRスペクトルである。

【図3】図3は本発明多糖類(4)の¹H-NMRスペクトルである。

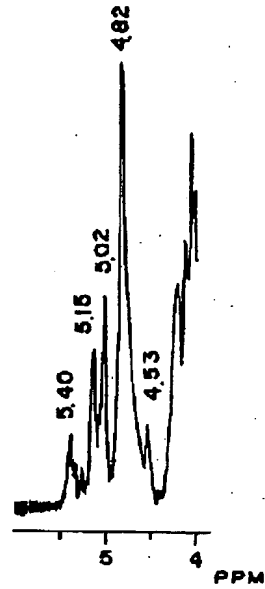
【図４】図４は本発明多糖類（２）の ^{13}C -NMRスペクトルである。

【図5】図5は本発明多糖類(4)の ^{13}C -NMRスペクトルである。

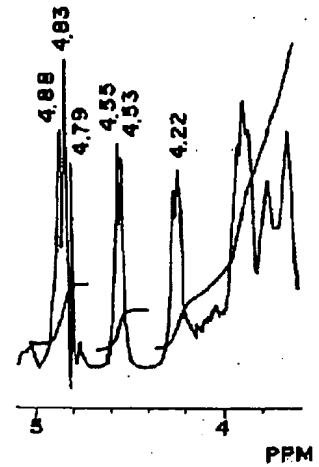
【図1】



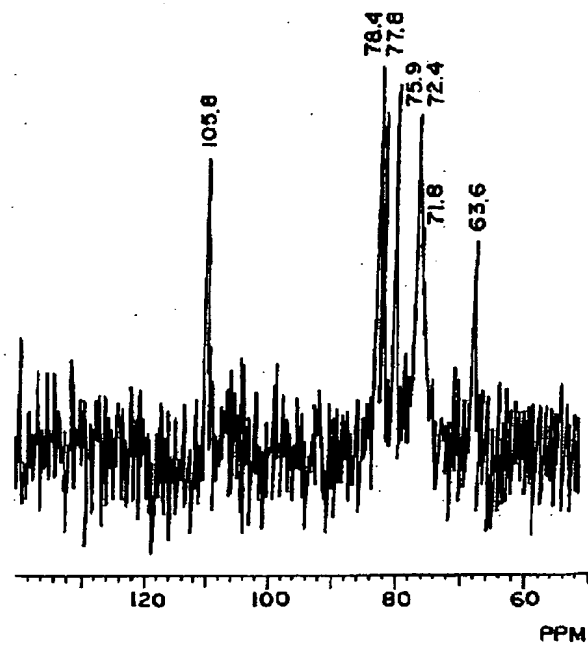
【図2】



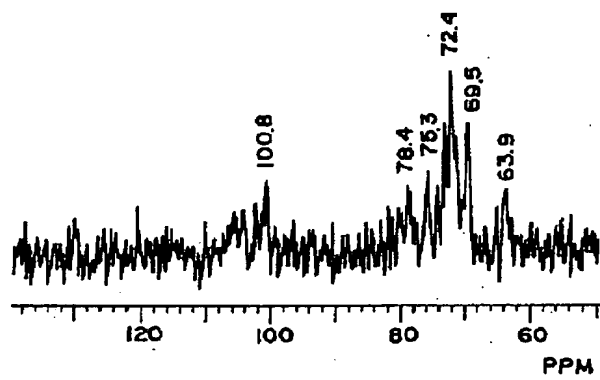
【図3】



【図5】



【図4】



【手続補正書】

【提出日】平成5年6月4日

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

*【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】キノコに由来する水溶性多糖類、その製造方法及び該水溶性多糖類を主剤とする抗腫瘍剤

フロントページの続き

(72)発明者 水野 卓
静岡県藤枝市青南町5丁目5-9

(72)発明者 馬 岩
静岡県静岡市大谷836

(72)発明者 伊藤 均
三重県津市城山2丁目3-10

(72)発明者 鈴木 千春
静岡県静岡市大谷3800-211